N° D'ORDRE : 124
SÉRIE U.

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

POUR OBTENIR LE

TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

(Mention Sciences)

PAR

J. FIRDMAN.

1re THÈSE : **Sensibilité thermique et pH optimum d'action des enzymes.**

2e THÈSE : **Proposition donnée par la Faculté.**

---

3 FEV 1938

Soutenues le 1938, devant la Commission d'Examen.

MM. E.F. TERROINE, *Président.*
R. BONNET,
Ch. STAEHLING, } *Examinateurs*

LONS-LE-SAUNIER.
IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME.
1938

N° d'ordre : 124
Série U.

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

POUR OBTENIR LE

TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

(Mention Sciences)

PAR

J. FIRDMAN.

1re THÈSE : **Sensibilité thermique et pH optimum d'action des enzymes.**

2e THÈSE : **Proposition donnée par la Faculté.**

3 FEV 1938

Soutenues le 1938, devant la Commission d'Examen.

MM. E.F. TERROINE, *Président.*
R. BONNET, } *Examinateurs*
Ch. STAEHLING, }

LONS-LE-SAUNIER.
IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME.
1938

FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Doyen..... M. A. DANJON, Professeur d'Astronomie.
Doyen honoraire... .. M. E. BATAILLON.
Professeurs honoraires MM. E. CHATTON, E. ESCLANGON, M. FRÉCHET, H. GAULT, M. GIGNOUX, L. HACKSPILL, E. de MARGERIE, G. RIBAUD, E. TOPSENT, G. VALIRON, H. VILLAT, P. WEISS.

Professeurs....

MM. E. ROTHÉ.....	Physique du Globe.
H. OLLIVIER.....	Physique générale.
C. HOUARD.....	Botanique.
E. TERROINE.....	Physiologie générale.
J. DE LAPPARENT.	Minéralogie et Pétrographie.
R. THIRY.....	Mécanique rationnelle.
G. CERF.....	Analyse supérieure.
G. DUBOIS.....	Géologie et Paléontologie.
P. FLAMANT . ..	Calcul différentiel et intégral.
E CORNEC.. .. .	Chimie générale.
P. DE BEAUCHAMP	Zoologie et Anatomie comparée.
L. BOUNOURE ..	Biologie générale.
R. ROMANN	Chimie minérale et Chimie physique.
G. FOEX.....	Physique expérimentale.
A. KIRRMANN....	Chimie organique.
H. CHERMEZON..	Botanique.
H. CARTAN.....	Mathématiques générales.
H. WEISS	Physico-Chimie des hydrocarbures.
L. NÉEL...	Physique générale.
N	Physique du Globe.
G. HUGEL.....	Chimie du pétrole.
R. HOVASSE.....	Biologie générale.
R. BONNET.....	Physique et Chimie biologiques.
R. HOCART.....	Minéralogie.

Maîtres de Conférences.

Ch. STAEHLING..	Chimie appliquée.
J. MARESQUELLE	Botanique.
A. CHRETIEN.....	Chimie minérale.
A. ROUSSEL.....	Mathématiques générales.
H. FORESTIER...	Chimie.
A. WEIL.....	Mathématiques.
J. ROTHÉ.....	Physique du Globe.
C. SADRON.....	Physique générale.
N.....	Zoologie.
N.....	Physique mathématique.

Secrétaire..... M. G. CUVIER.

R.UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

A MON PÈRE ET A MA MÈRE

A MES CHERS DISPARUS.

A MON CHER MAÎTRE,

MONSIEUR LE PROFESSEUR E.-F. TERROINE

DIRECTEUR DE L'INSTITUT DE PHYSIOLOGIE GÉNÉRALE
DE LA FACULTÉ DES SCIENCES DE STRASBOURG.
OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR.

Hommage de profonde reconnaissance et admiration.

A MON AMI

LE DOCTEUR J. GURFINKIEL

mes sentiments affectueux.

INTRODUCTION.

Dans les familles d'enzymes, on tend de plus en plus à distinguer les individus par des caractères physico-chimiques très précis. Deux jouissent d'un crédit particulier : *la sensibilité thermique*, définie à la fois par les limites de température à l'intérieur desquelles l'enzyme reste actif et le degré qui marque son optimum d'action ; *la sensibilité à la réaction du milieu*, établie surtout par la position du pH optimum.

Mais sensibilité thermique et pH optimum sont-ils des traits propres de l'enzyme lui-même ? Ne sont-ce pas là caractères contingents, peut-être variables, déterminés tantôt par les conditions qui président à l'élaboration de l'enzyme, tantôt par les substances qui s'accolent à lui dans les produits diastasifères que la nature prépare ?

C'est à l'étude de ces questions, dont la réponse est d'une importance égale pour le biochimiste et le physiologiste, que le présent travail est consacré.

Les expériences nécessitées par ce travail ont été effectuées au Laboratoire de l'Institut de Physiologie Générale de la Faculté des Sciences de Strasbourg, sous la direction de M. le Professeur E.-F. Terroine.

Je suis heureux de pouvoir exprimer ici mon admiration pour mon Maître, dont j'ai eu maintes fois l'occasion d'apprécier la haute compétence scientifique, la finesse d'esprit et la noblesse d'âme.

Je tiens à le remercier également de l'intérêt qu'il n'a cessé de me témoigner et de la bonté vraiment paternelle dont il a fait preuve à mon égard. Les conseils qu'il m'a prodigués m'ont notablement facilité les recherches entreprises, en vue de mon travail ; son encouragement précieux m'a permis de surmonter les obstacles qui se sont dressés sur mon chemin. Il me serait impossible de citer ici tous les

bienfaits dont je lui suis redevable. Je lui en garderai un souvenir affectueux et ineffaçable.

J'adresse aussi mes remerciements à M. le Professeur R. Bonnet pour les indications précieuses qu'il a bien voulu me donner et qui m'ont été utiles pour le travail effectué. Qu'il soit assuré de la reconnaissance que je lui garde pour les services qu'il m'a rendus.

Je prierai M. Staehling, Maître de conférences, d'agréer l'expression de mes vifs remerciement pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens à adresser tous mes remerciements à Mlles G. Mourot, P. Lelu et S. Valla, assistantes, dont l'amabilité et la précieuse collaboration m'ont facilité mon travail.

Que tous mes camarades de laboratoire : Mlles G. Boy, M. Kubler, A. Rajzmann ; MM. R. Jacquot, C. Lauresco, R. Razafimahery, H. Trimbach, P. Montel, J. Rouanet, J. Fournel sachent que je garde le plus doux souvenir du temps pendant lequel nous avons travaillé en commun.

CHAPITRE PREMIER.

L'optimum thermique de l'action des enzymes en fonction de leur origine et de leur degré de pureté.

§ 1. — Objet du travail.

La connaissance des températures extrêmes qui limitent le pouvoir des enzymes, ainsi que la recherche de leur température optimum d'action, ne présentent, au point de vue purement physico-chimique, qu'un intérêt assez médiocre. Ce sont là, en effet, données relativement contingentes ; elles dépendent, pour une part, des conditions du milieu dans lequel la diastase agit — pH, nature et concentrations des sels, etc. — et, pour une autre, de la durée pendant laquelle l'action se poursuit.

Mais cette connaissance, et tout particulièrement celle de la température optimum d'action, même avec les incertitudes qu'entraînent les variations de composition du milieu, est, au contraire, d'un intérêt capital, soit pour l'industriel qui fait appel à des agents diastasiques pour de multiples opérations, soit pour le physiologiste qui veut élucider le mécanisme des opérations digestives ou métaboliques chez l'ensemble des êtres.

Le second sait, en effet, depuis longtemps, qu'à de très rares exceptions près — l'hydrolyse de l'inuline par l'acide chlorhydrique du suc gastrique, par exemple — toutes les opérations digestives préalables à la réception des aliments dans l'intimité de l'organisme sont conduites par des agents diastasiques. D'autre part, chaque jour multiplie les faits montrant l'intervention de ces agents dans la succession des processus qui constituent le métabolisme intermédiaire.

Or, la température interne est très différente dans les divers groupes d'êtres ; constante et toujours élevée chez les homéothermes, très variable en fonction du climat et de la saison chez les poïkilothermes et parfois très basse. On comprend alors le grand intérêt que les physiologistes ont toujours témoigné aux recherches relatives à la sensibilité thermique des diastases et tout particulièrement à leur température optimum d'action.

Le degré de sensibilité et, plus encore, la position de l'optimum de température les ont amenés à envisager l'existence d'une adaptation thermique des enzymes aux conditions dans lesquels ils sont appelés à agir. En bref, ils se sont demandés si l'optimum thermique des enzymes fabriqués par les poïkilothermes n'était pas beaucoup plus bas que celui observé pour les enzymes élaborés par les homéothermes. Une telle différence permettrait, en effet, de comprendre, chez les premiers, la poursuite à basse température d'opérations identiques à celles qui se déroulent à température beaucoup plus élevée, entre 35 et 40° environ, chez les homéothermes. Il ne faut point oublier d'ailleurs, comme on l'a fait trop souvent, qu'ainsi posé sous sa forme générale le problème ne peut être limité aux animaux, mais s'étend naturellement aux microorganismes et aux végétaux dont la température propre dépend, tout comme celle des poïkilothermes, de la température extérieure.

Bien que la question de l'adaptation thermique des diastases ait été posée depuis plus de 60 ans, bien que son étude ait donné lieu à de nombreuses recherches, les données acquises, le plus souvent contradictoires, sont bien loin d'avoir apporté une réponse satisfaisante. Nous l'allons montrer par l'examen des faits les plus typiques. Bien entendu, on ne s'attendra point à trouver ici un exposé complet des phénomènes de sensibilité thermique des enzymes, tous se trouvant réunis dans les ouvrages d'ensemble consacrés à la chimie des ferments solubles. Nous choisirons parmi eux ceux dont l'incohérence commande la reprise de l'étude. Presque tous sont relatifs aux enzymes protéolytiques ; quelques uns à l'amylase.

Une profonde séparation divise les faits acquis dans le domaine de la protéolyse en deux groupes aboutissant à des conclusions diamétralement opposées. Toute une série d'observations tendent à montrer que, chez les poïkilothermes, la digestion est active à basse température, qu'elle l'est plus pour

des températures moyennes voisines de 20° que pour des températures plus élevées, 38-40°, ces dernières, au contraire, étant précisément celles pour laquelle la dégradation, soit pepsique, soit trypsique, présente son maximum de vitesse chez les homéothermes. Dès 1860, Brinton [4] affirme que, « la même chaleur qui est pratiquement nécessaire pour le fonctionnement de cet organe (estomac) chez un animal à sang chaud annihile l'efficacité de la pepsine de nombreux poissons ». Une observation plus précise, très fréquemment invoquée à l'appui de la doctrine de l'adaptation, est celle faite en 1873 par Fick et Murisier [9] : des extraits, dans une solution d'acide chlorhydrique, de muqueuse gastrique de Truite et de Brochet, présentent une activité plus intense à 10° qu'à 40° et agissent encore à 0°. Hoppe-Seyler [14] confirme ces faits par la mise en évidence d'une rapidité plus grande à 15° qu'à 40°, l'optimum se plaçant à 20°, de la dissolution d'un flocon de fibrine plongé dans un extrait de muqueuse de Brochet. Richet et Mourrut [26] déclarent, peu de temps après, que le poisson digère moins vite que le mammifère à 40°, mais plus vite à 32°, tandis que Krukenberg [16] enregistre une activité égale de pepsine de poisson, à 20° et à 40°. Des affirmations analogues, sinon identiques, ont été renouvelées beaucoup plus près de nous. Riassenzew [25] relève l'égalité d'action, à 20° et à 40°, des extraits de muqueuse gastrique de Brochet, de Perche et de Grenouille ; Rakoczy [24] montre que les macérats de muqueuse gastrique de chien digèrent l'édestine 4 fois plus vite que ceux du Brochet à 18° et 2 fois seulement à 0° ; que tous deux agissent sur la fibrine avec une même intensité à 18°, mais que ceux du Brochet vont deux fois plus vite à 0°. Et, en 1931, Yo [40] constate que les extraits de pancréas de la Roussette hydrolysent très rapidement le gluten à 13° et se comportent comme une trypsine dont l'optimum de température serait situé beaucoup plus bas.

Mais si les affirmations se poursuivent ainsi tout le long de l'histoire des enzymes protéolytiques, les négations ne sont guère moins nombreuses ni moins vigoureuses. Dès 1878, l'étude de la puissance digestive d'extraits glycérinés de muqueuse stomacale de Brochet, de Sandre et de Saumon permet à Luchau [19] de conclure que cette puissance est plus grande à 40° qu'à 15°.

Au cours d'une longue étude sur la digestion chez les poissons, Young [41] constate que les extraits de muqueuse gas-

trique de *Scyllium* dissolvent l'albumine complètement en 3 heures à 38° alors que, dans le même temps, on n'observe à 18° qu'un simple gonflement. C'est un fait analogue qu'enregistre Sullivan [32] chez les nombreux poissons étudiés par lui, la pepsine qu'il extrait de leur muqueuse gastrique peptonisant mieux la fibrine à 38° qu'à 20°. Même constatation est faite encore : par Hoppe-Seyler [14] sur l'Ecrevisse dont le suc gastrique digère la fibrine coagulée ou la serumalbumine beaucoup plus rapidement à 40° qu'à 15° ; par Hammarsten [13] sur le Brochet dont l'extrait gastrique dissout la fibrine en 25 minutes à la température de la chambre et en 7 minutes à 38° ; par Mueller [21] qui situe à 40° l'optimum de la pepsine de Grenouille.

Des affirmations aussi contradictoires ne permettent aucune conclusion. Peut-être leur opposition tient-elle, en partie, à ce que, dans bien des cas, on s'est contenté d'observer une dissolution de fibrine crue, laquelle peut parfaitement s'opérer sans l'intervention des enzymes digestifs (Dastre [6]).

Les faits relatifs à l'amylase sont beaucoup moins nombreux. Dans des travaux japonais qu'il nous a été impossible de nous procurer et dont nous ne connaissons les conclusions que par Chesley [5], l'existence d'une adaptation serait affirmée d'après une étude sur la Grenouille (Hosaka [15], et niée par une autre étude sur le poisson (Oya et Harada [22]). Chesley [5], qui renouvelle lui-même ce genre de recherche, fait porter ses investigations sur l'amylase de la salive humaine, celle du pancréas de deux reptiles (*Terrapene carolina* et *Chrysemis* p.) et d'un poisson (*Brevoortia tyrannus*). La température optimum d'action serait plus élevée pour l'homme que pour le reptile, plus élevé pour ce dernier que pour le poisson. L'amylase de poisson agirait beaucoup plus efficacement que les deux autres à 3°,5. Ici encore, les résultats ne sont point assez concordants pour qu'une opinion ferme puisse être formulée.

Il nous a donc paru que la question de l'adaptation thermique devait être reprise, son étude appliquée à plusieurs enzymes choisis parmi ceux dont l'activité se mesure aisément et avec une rigoureuse exactitude et qu'on rencontre chez de multiples espèces animales tant homéothermes que poïkilothermes.

Si, au lieu de restreindre l'examen du problème aux seuls animaux on l'étend, comme il convient de le faire, à la totalité des êtres vivants, la notion d'une adaptation thermique devient absolument indéfendable. En effet, dans l'intéressant exposé d'ensemble qu'il faisait en 1933 sur les applications industrielles des diastases, Pénau [23] disait, en ce qui regarde les amylases, que celles du malt présentent un optimum à 60°, les bactériennes à 80°, les fungiques à 60°, les pancréatiques à 45°-50°. Or, si les mécanismes diastasiques étaient adaptés aux conditions biologiques de leur intervention, la position élevée des optima respectifs des amylases végétales et bactériennes serait parfaitement incompréhensible. Toutefois un classement aussi précis ne paraît pas répondre à toutes les observations faites ni pouvoir s'appliquer à d'autres catégories d'enzymes.

Si Slosse et Limbosch [30] montrent, en ce qui regarde l'amylase salivaire, la grande variabilité des opinions formulées avant eux (on trouvera dans leur travail de nombreuses références sur la question), ils sont amenés à accorder à cet enzyme une température optimum d'action de 50°-58°, ce qui le rapproche beaucoup du malt. Et, de leur côté, Weitz et Lecoq [38] déclarent que « les températures optima trouvées pour la ptyaline de la salive correspondent à celles de l'amylase de l'orge germé précédemment essayée : à savoir + 50° pour les amylacés cuits et + 70° pour les amylacés crus ». D'autre part, Effront [8] accorde un même optimum de température aux amylases animales et bactériennes (40°) qu'ils séparent de l'amylase des grains germés (60°). Sans doute est-on frappé par le fait que les enzymes des végétaux supérieurs et, quelquefois, ceux des bactéries, paraissent agir à température plus élevée. Delezenne, Mouton et Pozerski [7], en ont donné un bel exemple dans le cas de la papaïne. Pour l'uréase, Van Slyke et Cullen [31] assignent un optimum de 55° à celle du Soja alors que celle d'une moisissure (*Aspergillus orhizae*) agit au mieux à 44-45° (Bach [1]) et celle des champignons supérieurs seulement à 38° (Goris et Costy, [11]). Dans le cas de la lipase, celle du suc pancréatique de Chien aurait son optimum à 40° avec des différences d'activité d'ailleurs assez peu marquées entre 20° et 40° (Terroine, [33]), alors que celle extraite de diverses bactéries (fluorescens, pyocyaneus, liquefaciens) supporterait un chauffage de 5 minutes à 100°. Mais rien ne dit qu'il y ait dans la plus fai-

ble sensibilité thermique des enzymes des végétaux supérieurs, tout comme dans celle des bactéries, un phénomène général s'étendant à toutes les catégories d'enzymes. En ce qui regarde ces dernières Marxer [20] ne fixe-t-il pas l'optimum d'action des enzymes protéolytiques du B. subtilis entre 38° et 39° ? Nous avons donc cru utile de profiter de la présente étude pour procéder à l'examen comparatif de plusieurs catégories d'enzymes, d'origine variée (animaux, végétaux supérieurs, champignons, bactéries).

Enfin, tout le problème nous paraît dominé par une préoccupation dont nous avons trouvé peu de traces dans les travaux de nos prédécesseurs : celle du caractère contingent ou nécessaire de l'optimum de température. Certes, nous n'ignorons point les très nombreuses études ayant dégagé l'influence du pH, celle de la présence de sels ; si nous ne les citons point ici, c'est qu'elles n'y ont que faire. Ce que nous voulons dire est autre chose. L'enzyme étudié n'est, dans tout produit diastasifère, qu'une part infime de l'ensemble des substances présentes. Les matières qui l'accompagnent varient avec l'origine ; dans du suc pancréatique, dans un extrait de malt, dans un bouillon bactérien, l'amylase trouve à ses côtés des substances bien différentes. Lorsqu'on tente de fixer la sensibilité thermique d'une diastase, est-ce bien celle de la diastase elle-même qu'on atteint et non pas, tout simplement, celle des substances parasites auxquelles elle est mêlée ? Les caractères physico-chimiques des matières albuminoïdes presque toujours présentes, leur abondance, leur plus ou moins grande facilité de coagulation par la chaleur ne sont-ils pas, pour la sensibilité thermique d'une préparation diastasifère, des éléments au moins aussi importants que les caractères mêmes de l'enzyme ? Certaines observations de Lecoq [18] le donnent à penser. Cet auteur relève des optimums de température très différents pour les amylases de la farine de malt, des extraits de malt pâteux, sec ou en paillettes, et de la diastase du Codex. Expressément d'ailleurs, il indique qu'il peut y avoir là une influence accessoire et, en dehors du pH et des sels, il invoque, en particulier, la possibilité d'intervention de la colloïdité. Les procédés d'absorption et d'élution spécifiques, mis au point par Willstatter et ses collaborateurs, nous permettent d'avoir des enzymes, sinon rigoureusement purs, tout au moins grandement débarrassés de tous les matériaux acces-

soires qui polluent les solutions naturelles. On conviendra qu'il était d'un grand intérêt de savoir : si l'optimum attribué à un enzyme brut se retrouvait chez le même enzyme purifié par le procédé de WILLSTÄTTER ; si les différences en fonction de l'origine, pour une même catégorie d'enzymes, persistent après l'éviction des substances variées que les accompagnent. C'est ce que nous avons recherché.

Au total :

Reprendre sur plusieurs groupes d'enzymes, choisis parmi ceux qui présentent une assez large répartition chez les êtres vivants, la question de savoir si l'optimum de température de l'activité est fonction, ou non, de la température habituelle des êtres qui les élaborent et s'il y a, ou non, une adaptation thermique aux conditions biologiques d'intervention des enzymes ;

Rechercher, pour des types d'action assez différents, si la sensibilité thermique, mesurée par la position de l'optimum d'action, est toujours moins marquée pour les enzymes des végétaux supérieurs, et moins encore pour ceux des bactéries que pour ceux élaborés par les animaux ;

Rechercher si l'optimum thermique d'un enzyme est un caractère de l'enzyme lui-même ou s'il dépend plus ou moins des matériaux qui l'accompagnent dans les produits naturels qui le renferment ;

Tel est le triple but du présent travail.

§ 2. — Technique.

Les procédés employés, soit pour l'obtention des enzymes, soit pour la mesure de leur activité, varient naturellement avec chaque catégorie. Ils doivent donc être décrits séparément pour chacun des types étudiés. Toutefois il est certains procédés d'étude communs qu'il est d'abord nécessaire d'indiquer.

1° TECHNIQUES COMMUNES A TOUS LES ENZYMES ÉTUDIÉS. — D'une manière générale, les liquides diastasifères - produits naturels ou solutions - et les substances dissoutes qu'ils doivent attaquer sont séparément amenés à la température où cette action doit être observée afin d'être à cette température au moment même de leur mélange. Ceci demande toujours très peu de temps car les quantités mises en œuvre sont faibles et

l'équilibre de température est rapidement atteint puisque les récipients sont placés dans l'eau d'un thermostat.

On fait autant de mélanges identiques qu'il est prévu de prises. Chaque mélange est intégralement utilisé pour le dosage des produits formés. L'un d'eux est pris immédiatement en vue d'une première détermination qui sert de témoin. Ce témoin est souvent nécessaire. Si, par exemple, on se renseigne sur l'activité d'un enzyme agissant sur les glucides par la mesure du pouvoir réducteur, le mélange contient très fréquemment de petites quantités de substances réductrices au départ. Dans le cas de la protéolyse évaluée par la méthode de Van Slyke, il est également indispensable de déterminer l'azote aminé libre du début. Toutes les valeurs réunies dans les tableaux expérimentaux expriment donc les quantités formées au moment de la mesure ; elles sont calculées par différence entre celles réellement déterminées à ce moment et celles présentes avant toute action dans une prise de même volume.

D'autre part, on sait depuis longtemps que la température optmium d'action d'un enzyme, résultante de la vitesse de la réaction observée et de la vitesse de destruction de l'enzyme, varie avec le moment de l'observation. Cet optimum se place d'autant plus bas que la durée d'action est plus longue, la destruction prenant avec le temps une importance de plus en plus grande. Il semble bien toutefois que cet abaissement est médiocre dans les premiers temps de l'action puisque, dans le cas de la salicinase d'amandes, Bertrand et Compton [2] trouvent les variations suivantes :

1 heure.....	57°2	15 heures.....	42°3
2 heures.....	54°6	64 heures.....	30°5
8 heures.....	42°4	96 heures.....	30°5

Dans ces conditions nous avons cru qu'il importait de faire plusieurs mesures, mais à l'intérieur d'une durée totale très restreinte. Jamais l'action n'a été poursuivie au-delà de 140 minutes. L'échelle des températures étudiée a été suffisamment grande pour qu'on put saisir, outre l'optimum, le début et la fin de l'activité dans tous les cas étudiés.

Enfin, un point important est celui relatif à l'influence de la réaction du milieu car le degré de sensibilité thermique en dépend. Ici, nous nous sommes trouvé devant une difficulté assez grande. A quel pH convient-il de placer les enzymes à comparer pour être en droit de tirer des conclusions, non sur

eux-mêmes ce qui n'est point notre but, mais sur leur activité dans les conditions réelles de leur intervention dans les processus biologiques ?

Certainement pas un même pH pour une même catégorie d'enzymes, car il n'est pas douteux, par exemple, que la diastase de l'orge germée ne trouve pas dans le grain les mêmes conditions que celles qui président aux opérations de l'amylase du suc pancréatique dans l'intestin.

Pas davantage au pH optimum d'action de chaque enzyme car il est, en effet, très fréquent que ce pH optimum, précisé in vitro, ne soit nullement celui auquel opère l'enzyme dans les conditions naturelles. Terroine [35] a récemment insisté sur ce fait en montrant que, dans le cas des enzymes trypsiques, le pH optimum doit être fixé aux environ de 8 alors que les conditions réalisées dans l'intestin grêle font que la réaction du contenu de ce dernier reste toujours franchement acide pendant tout le temps que le suc pancréatique agit ; la vitesse de la dégradation physiologique réalisée par les enzymes trypsiques n'atteindrait ainsi que 60 p. 100 environ de ce qu'elle pourrait être. Il en va tout de même pour les enzymes protéolytiques du type érepsique contenu dans le suc intestinal et pour lesquels Terroine [35] montre que « les conditions de réaction normalement réalisées sont loin d'être les plus favorables ».

Devant ces difficultés, il nous a paru que le procédé le plus convenable était de ne point faire intervenir un mélange tampon à pH fixe, mais de se contenter de faire agir le liquide diastasifère tel qu'il est directement obtenu et sans aucune adjonction

Au surplus, le procédé qui consiste à tamponner les mélanges en réaction, excellent sans doute lorsqu'il s'agit de se renseigner sur les caractères physico-chimiques des opérations enzymatiques, est fortement contestable si l'on veut avoir une image aussi peu déformée que possible des conditions biologiques de l'intervention des enzymes. Tous les corps employés pour réaliser un tampon — sels divers, acides aminée — ne sont nullement inertes ; leur présence peut modifier sensiblement le cours de la réaction et ne pas le faire d'une manière égale pour tous les représentants d'une même catégorie. Rappelons seulement que l'emploi de tampons, universellement répandu aujourd'hui, n'aurait point permis la mise en évidence de faits aussi importants pour la connais-

sance des actions diastasiques que celui de l'inactivité complète de certains enzymes en l'absence d'électrolytes.

Le but que nous visons étant essentiellement d'ordre physiologique, nous avons cru nous approcher davantage des conditions naturelles en laissant agir directement le suc ou le liquide diastasifère sur son substrat sans chercher à maintenir un pH déterminé par l'adjonction d'un mélange tampon.

2° Procédés d'obtention des enzymes. — Comme des représentants des diverses catégories étudiées se rencontrent parfois dans un même produit, les procédés d'obtention seront indiqués en passant successivement en revue, non les enzymes eux-mêmes, mais les sucs naturels ou les préparations qui les renferment.

a) *Suc pancréatique.* Il s'agit du suc de Chien, récolté aseptiquement par cathétérisme extemporané du canal de Wirsung chez des animaux recevant des injections répétées de sécrétine. Nous le devons à l'obligeance de M. Magne, à qui nous adressons nos plus vifs remerciements. Dans ce suc ont été étudiés l'*amylase* et la *tryptase*. L'activité de cette dernière est obtenue par adjonction au suc de petites quantités d'une solution d'entérokinase préparée par le procédé de Larguier des Bancels [17].

b) *Sucs digestifs des Mollusques.* — Ces sucs sont obtenus par ponction du tube digestif suivant les indications de Bierry [3] pour l'Escargot, de Giaja [10] pour l'Aplysie. Ce tube en est rempli et le suc n'est point pollué de déchets alimentaires, si l'on prend soin de faire jeûner les animaux plusieurs jours avant le prélèvement. On obtient ainsi des quantités abondantes d'un liquide visqueux, brun foncé, parfaitement limpide, possédant une très grande puissance hydrolysante à l'égard de multiples glucides. Nous avons utilisé ces sucs pour l'étude de l'*amylase*, de la *sucrase*, de la *lactase* et de l'*émulsine*.

c) *Extrait de muqueuse intestinale de Chien.* — La muqueuse du duodéno-jéjunum est détachée de l'intestin après lavage, broyée avec du sable fin, additionnée de 5 volumes d'eau saturée de chloroforme. Le tout est abandonné à l'étuve à 37° pendant 24 heures, au bout de ce temps, on centrifuge et on filtre. Le liquide obtenu contient, en particulier, une *sucrase* et une *lactase*.

d) *Extrait de levure de bière.* — La préparation est obtenue comme la précédente. Il y a été fait appel pour l'obtention de *sucrase* et d'*émulsine.*

e) *Extrait d'amandes.* — Les amandes sont aisément décortiquées grâce à une immersion préalable et de courte durée dans l'eau bouillante. Elles sont broyées dans un mortier avec 4 à 5 volumes d'eau distillée tiède. On ajoute ensuite quelques gouttes d'acide acétique et on filtre. La solution est utilisée pour l'étude de l'*émulsine.*

f) *Extrait de malt.* — Il s'agit d'un produit commercial préparé par les établissements Progil pour des usages industriels et renfermant une *amylase* très active.

g) *Liquides de culture du Bacillus mesentericus vulgatus.* — Des travaux antérieurs ont établi que pour obtenir un liquide jouissant d'un fort pouvoir amylolytique, il faut offrir au microorganisme un milieu pauvre en amidon et riche en protéines. En revanche, l'obtention d'un produit fortement protéolytique exige le développement du bacille sur un milieu riche en amidon et très pauvre en azote. On a donc utilisé les bouillons de culture ci-dessous :

Pour l'obtention de l'amylase

Eau de la ville	100 cm³
Tourteau d'arachide	5 g.
Extrait de malt	1 g.
Phosphate tripotassique	0 g.,1

Pour l'obtention de la protéidase

Eau de la ville	100 cm³
Son de froment	4 g.

le tout porté à l'ébullition pendant 30 minutes, puis filtré.

Les milieux sont placés dans des ballons à fond plat et col court de 350 cm³, stérilisés, ensemencés et portés à l'étuve à 37°.

Après 7 jours pour le premier, 3 à 4 jours pour le second, on centrifuge énergiquement et on filtre. Les liquides séparés sont conservés à la glacière après addition de toluène et de thymol.

3° Préparation de solutions d'enzymes isolés. — L'étude des propriétés des enzymes séparés de leur milieu de production a été limitée au groupe des amylases.

Dans le cas de l'amylase pancréatique, on a fait appel au

procédé de Willstätter, Waldschmidt-Leitz et Hesse [39], mais en l'appliquant au suc et non à l'extrait glycériné du tissu.

Dans le cas des extraits de malt, on a utilisé la technique de Sabalitschka et Weidlich [29] et l'on a fait de même pour le liquide de culture de *Bac. mes. vulg.*

4° Méthodes de mesure. — Les déterminations ont toujours consisté en un dosage permettant un renseignement précis sur la décomposition du corps attaqué :

— pour tous les enzymes agisant sur les glucides et dont l'activité provoque l'apparition (amylase, sucrase, émulsine) ou le renforcement (lactase) d'un pouvoir réducteur, celui-ci a été déterminé dans chaque prise par la méthode de Bertrand ;

— pour les enzymes protéolytiques, on a fait deux groupes d'essais comportant tous deux une attaque de la caséine : dans l'un, l'activité est mesurée par disparition de la protéine, les quantités restantes étant connues par pesée du précipité déterminé par addition d'acide acétique ; dans l'autre, on se renseigne sur l'intensité de la dégradation par l'évaluation des groupements aminés libres à l'aide de la méthode de Van Slyke.

§ 3. — **Résultats expérimentaux.**

Les résultats expérimentaux sont réunis dans les tableaux I à VI. Il est bien entendu qu'on ne doit faire aucune comparaison entre les puissances respectives des divers représentants d'un même groupe d'enzymes, la concentration en agent actif pouvant varier grandement d'un produit à un autre. Ce qui importe seul, ce n'est pas la quantité en valeur absolu de substance dégradée par chacun des enzymes considérés, c'est la température pour laquelle cette quantité est la plus élevée pour une même durée d'action.

Les conditions dans lesquelles nous avons opéré font aisément apparaître cette température. Dans tous les cas examinés, elle reste, en effet, la même pendant toute la durée des essais ; ceux-ci n'ayant jamais été prolongés au-delà de 140 minutes le phénomène de destruction influe sans doute trop peu encore pour abaisser la position de l'optimum.

Les résultats, en eux-mêmes, n'obligent à aucune autre observation.

TABLEAU I.

Influence de la température sur l'activité des amylases.
(Tous les nombres expriment des mg. de maltose).

durée d'action en minutes	5°	10°	15°	20°	25°	30°	33°	35°	38°	40°	42°	45°	50°	55°	60°	65°	70°	75°	80°	85°	90°
I. *Sue pancréatique* (10 cm³ empois d'amidon à 2 p. 100 + 0 cm³,25 suc pancréatique.																					
20	10	11	12	14	16	17	—	26	**38**	30	26	18	20	—	16	—	10	—	—	—	—
40	11	12	13	16	18	17	—	33	**45**	40	36	25	25	—	20	—	10	—	—	—	—
60	13	14	15	20	20	23	—	36	**57**	46	36	32	31	—	27	—	10	—	—	—	—
80	14	14	15	22	24	35	—	38	**61**	50	47	32	38	—	28	—	10	—	—	—	—
100	14	16	17	22	26	38	—	42	**66**	64	59	34	38	—	28	—	10	—	—	—	—
120	15	16	18	26	31	40	—	42	**80**	76	63	38	38	—	28	—	10	—	—	—	—
140	15	16	18	27	33	42	—	43	**89**	85	63	40	40		29	—	10	—	—	—	—
II. *Suc hépatopancréatique d'Escargot.* 10 cm³ empois d'amidon à 2 p. 100 + 0 cm³.25 de suc dilué au 1/5).																					
20	10	11	22	24	25	25	26	**26**	23	20	—	13	—	—	traces	—	—	—	—	—	—
40	11	20	26	29	29	30	31	**33**	24	22	—	24	17	16	id.	—	—	—	—		—
60	14	26	31	32	37	37	38	**45**	38	37	—	24	19	16	id.	—	—	—	—	—	—
80	16	29	32	42	48	49	52	**55**	48	46	—	28	21	17	id.	—	—	—	—	—	—
100	20	31	40	50	57	59	60	**63**	58	50	—	36	22	17	id.	—	—	—	—	—	—
120	25	31	46	52	57	63	63	**72**	63	61	—	40	27	21	id.	—	—	—	—	—	—
140	27	40	46	59	68	72	73	**75**	63	61	—	47	30	22	id.	—	—	—	—	—	—
III. *Suc de Aplysia punctata.* (10 cm³ empois d'amidon à 2 p. 100 + 0 cm³,25 de suc dilué au 1/3.																					
20	—	27	41	45	57	58	—	62	**71**	61	58	52	41	41	13	—		—	—	—	—
40	—	43	66	67	75	78	—	81	**85**	81	77	66	50	48	13	—	—	—	—	—	—
60	—	57	70	76	88	92	—	95	**98**	97	97	75	63	61	15	—	—	—	—	—	—
80	—	69	76	87	102	102	—	102	**116**	106	104	100	81	69	15	—	—	—	—	—	—
100	—	82	88	95	103	106	—	108	**117**	110	108	102	85	81	15	—	—	—	—	—	—
120	—	87	100	104	108	110	—	110	**120**	114	112	110	93	89	15	—	—	—	—	—	—
140	—	92	112	108	110	114	—	116	**124**	116	114	112	97	93	15	—	—	—	—	—	—
IV. *Extrait de malt.* (10 cm³ empois d'amidon à 2 p. 100 + 0 cm³,25 d'une solution d'extrait à 7,5 p 100)																					
20	2	3	7	7	7	8	—	13	—	13	—	16	28	23	**31**	16	25	—	—	—	—
40	2	5	13	15	13	15	—	21	—	27	—	36	40	41	**41**	31	33	—	—	—	—
60	6	8	15	16	17	20	—	27	—	36	—	41	52	54	**56**	34	38	—	—	—	—
80	7	9	15	18	20	21	—	33	—	45	—	52	56	66	**67**	43	38	—	—	—	—
100	7	9	17	21	22	29	—	38	—	60	—	56	62	68	**73**	44	38	—	—	—	—
120	7	9	19	22	25	31	—	38	—	64	—	62	68	71	**75**	44	38	—	—	—	—
140	8	10	20	24	26	34	—	36	—	64	—	66	69	71	—	44	40	—	—	—	—
V. *Liquide de culture du Bacillus mesentericus vulgatus.* (10 cm³ empois d'amidon à 2 p. 100 + 10 cm³ liquide de culture).																					
20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	11	14	15	**16**	15	11
40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	11	14	20	21	**22**	18	14
60	—	—	—	—	—	—	—	10	—	11	—	12	14	14	15	17	26	26	**30**	24	14
80	—	—	—	—	10	11	—	14	—	16	—	16	16	17	19	23	35	35	**36**	26	14
100	—	—	—	—	12	12	—	16	—	21	—	21	22	22	24	30	35	35	**36**	26	14
120	—	—	—	—	12	14	—	17	—	24	—	25	25	26	28	34	38	38	**41**	26	15

TABLEAU II.

Influence de la température sur l'activté des sucrases (tous les nombres expriment des mg. de sucre interverti).

Durée d'action en minutes	Quantité de sucre interverti formé pour les températures de :											
	10°	15°	20°	25°	30°	35°	40°	45°	50°	55°	60°	65°
I. *Muqueuse intestinale du Chien* (10 cm³ sol. saccharose 1 p. 100 + 5 cm³ extrait aq. de muqueuse).												
40	—	—	—	—	—	—	—	**10**	—	—	—	—
60	—	—	—	—	12	12	14	**20**	10	—	—	—
80	—	—	—	—	15	15	16	**28**	14	—	—	—
100	—	—	—	11	17	19	20	**32**	16	—	—	—
120	—	—	—	13	19	21	23	**34**	18	—	—	—
II. *Suc hépatopancréatique d'Escargot* (10 cm³ sol. saccharose 3 p. 100 + 0 cm³,25 suc dilué au 1/5).												
20	—	—	—	—	—	**11**	—	—	—	—	—	—
40	—	—	—	—	—	**13**	10	**11**	—	—	—	—
60	—	—	—	—	10	**15**	13	14	—	—	—	—
80	—	—	—	10	**11**	**18**	14	**15**	—	—	—	—
100	—	—	10	11	**11**	**20**	17	16	—	—	—	—
120	—	—	10	12	12	**24**	19	19	—	—	—	—
140	—	—	11	12	12	**24**	22	22	10	—	—	—
III. *Suc d'Aphysia punctata* (10 cm³ sol. saccharose 3 p. 100 + 0 cm³,5 suc dilué au 1/3).												
40	—	—	—	12	**14**	10	—	—	—	—	—	—
60	—	—	10	16	**17**	15	10	—	—	—	—	—
80	—	10	13	19	**21**	19	11	—	—	—	—	—
100	—	12	16	20	**23**	19	13	—	—	—	—	—
120	—	14	17	22	**24**	22	14	—	—	—	—	—
140	—	16	19	23	**25**	23	17	—	—	—	—	—
IV. *Levure de bière* (10 cm³ sol. saccharose 3 p. 100 + 0 cm³,1 extrait aqueux de levure).												
20	**10**	10	10	28	28	31	35	39	39	**56**	26	11
40	15	19	23	46	50	58	67	69	69	**85**	60	21
60	19	21	24	66	92	92	102	108	110	**116**	60	23
80	28	30	33	92	102	116	120	120	122	**126**	71	23
100	37	40	41	114	122	124	130	138	152	**166**	71	23
120	41	44	45	124	134	138	146	148	168	**180**	71	23

TABLEAU III.

Influence de la température sur l'activité des lactases.

Durée d'action en minutes	Accroissement du pouvoir réducteur mesure en mg. de Cu pour les températures de :								
	20°	25°	30°	35°	40°	45°	50°	55°	60°
I. *Muqueuse intestinale du Chien* (10 cm³ d'une sol de lactose à 0.75 p. 100 + 2 cm³,5 extrait aq. de muqueuse.)									
20	2	2	3	4	4	4	**6**	4	2
40	2	3	3	5	5	5	**6**	4	2
60	2	4	4	5	5	6	**6**	5	3
80	3	4	5	6	7	7	**7**	5	3
100	4	5	5	7	7	7	**8**	6	3
120	4	5	6	7	7	7	**9**	6	3
II. *Suc hépatopancréatique d'Escargot* (10 cm³ d'une sol. de lactose à 0 g.,75 p. 100 + 1 cm³ suc dilué au 1/5).									
20	7	7	9	18	18	21	**25**	16	3
40	10	12	13	24	24	27	**28**	17	3
60	12	14	15	26	26	29	**31**	20	3
80	13	14	15	29	30	30	**32**	21	3
100	14	16	17	31	31	33	**34**	22	3
120	16	18	19	33	33	35	**36**	22	3
III. *Suc d'Aplysia punctata* (10 cm³ d'une sol. de lactose à 0 g.,75 p. 100 + 1 cm³ suc dilué au 1/3).									
20	7	7	8	9	9	9	**10**	9	9
40	8	9	9	10	12	15	**15**	11	9
60	9	10	11	13	14	15	**17**	12	9
80	11	12	14	15	15	16	**20**	15	9
100	12	12	14	18	18	18	**23**	15	11
120	12	13	14	19	19	19	**26**	16	11

TABLEAU IV.

Influence de la température sur l'activité des émulsines.

Durée d'action en minutes	Pouvoir réducteur en mg. de glucose pour les températures de :									
	20°	25°	30°	35°	40°	45°	50°	55°	60°	65°
I. *Suc hépatopancréatique d'Escargot* (10 cm³ sol. amygdaline 3 p. 100 + 0 cm³,25 suc dilué au 1/5).										
20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
60	—	—	—	—	13	—	—	—	—	—
80	—	—	—	13	17	11	—	—	—	—
100	—	—	13	15	22	14	—	—	—	—
120	—	—	15	19	28	16	—	—	—	—
140	—	10	16	22	30	17	—	—	—	—
II. *Suc d'Aplysia punctata* (10 cm³ sol. amygdaline 3 p. 100 + 1 cm³,5 suc dilué au 1/3)										
40	—	—	—	—	—	15	19	17	traces	—
60	—	—	—	—	12	20	31	23	id.	—
80	—	—	11	12	22	29	52	36	id.	—
100	—	—	14	18	29	42	58	44	id.	—
120	—	13	16	23	35	46	65	48	id.	—
III. *Extrait d'amandes* (10 cm³ sol. amygdaline 4 p. 100 + 0 cm³,25 d'extrait).										
20	—	—	16	16	26	26	32	32	24	—
40	10	16	26	34	46	48	58	54	30	10
60	15	24	36	54	67	67	84	64	30	10
80	21	29	50	66	92	96	98	84	30	10
100	29	41	66	78	108	120	134	100	30	10
120	37	49	80	89	122	128	140	110	30	10
IV. *Levure de bière* (10 cm³ sol. amygdaline 2,5 p. 100 + 10 cm³ extrait de levure).										
40	—	—	—	—	—	10	10	—	—	—
60	—	—	—	10	12	15	15	—	—	—
80	—	—	10	12	15	19	18	10	—	—
100	—	10	12	15	20	22	21	12	—	—
120	—	12	15	18	23	26	25	15	—	—

TABLEAU V.

Influence de la température sur l'activité des protéidases.

Durée d'action en minutes	Temperatures : 5°	10°	15°	20°	25°	30°	35°	38°	40°	42°	45°	50°	55°	60°	65°	70°	75°	80°	90°
I. *Suc pancréatique kinasé* (tous les mélanges contiennent : 218 g. de caséine dissoute dans une solution de CO_3Na_2 à 3 p. 1000, 2 cm_3 de suc pancréatique, 0 cm^3,35 d'une solution d'entérokinase ; le volume total est de 12 cm^3,5. Les nombres ci-dessous donnent les poids de caséine digérée en mg.)																			
30	37	53	58	63	98	131	143	**173**	158	163	164	164	—	146	—	18	—	—	—
60	62	79	87	93	131	160	174	**194**	190	188	186	183	—	164	—	23	—	—	—
90	78	103	115	121	155	182	188	**195**	188	188	188	-	—	165	—	23	—	—	—
120	97	125	131	133	159	188	**196**	**196**	191	188	—	—	—	167	—	26	—	—	—
150	113	143	148	153	168	193	**199**	**198**	196	198	188	189	—	173	—	26	—	—	—
II. *Suc pancréatique kinasé* (conditions d'expérience identiques à celles ci-dessus ; mais la marche est suivie par des dosages de N aminé par la méthode de Van Slyke. Les nombres ci-dessous représentent l'accroissement de N aminé libre en mg.)																			
20	—	—	—	0	0	0,28	0,97	2,08	3,47	—	4,17	4,86	**6,11**	3,06	1,39	0,14	—	—	—
40	—	—	—	0	0,42	**1,11**	1,94	3,47	4,86	—	4,86	4,96	**6,67**	4,86	—	0,28	—	—	—
60	—	—	—	0,69	1,35	1,81	2,51	4,45	—	—	5,42	—	**6,95**	5,98	1,67	0,28	—	—	—
80	—	—	—	0,69	1,94	2,64	4,31	4,86	5,23	—	6,25	6,53	**8,62**	6,25	1,78	0,28	—	—	—
100	—	—	—	2,08	2,78	3,47	4,72	5,96	7,23	—	7,37	8,20	**9,59**	—	1,78	0,28	—	—	—
120	—	—	—	2,36	3,06	4,03	4,86	6,25	7,64	—	7,64	8,62	—	—	1,78	0,28	—	—	—
140	—	—	—	2,36	3,06	4,17	4,86	6,25	7,64	—	—	9,03	**9,73**	6,53	1,78	0,28	—	—	—
III. *Liquide de culture de Bacillus mesentericus vulgatus* (tous les mélanges contiennent 10 cm^3 d'une solution de caséine pure à 3 p. 100 dans le CO_3Na_2 à 3 p. 1000 et 2 cm^3,5 du liquide de culture. Les nombre ci-dessous représentent l'accroissement de N aminé libre en mg.).																			
20	—	—	—	—	1,38	1,67	1,94	—	**2,25**		2,64	3,18	3,73	4,20	**4,45**	3,71	3,63	1,06	1,53
40	—	—	—	—	2,21	2,22	2,36	—	2,68	—	2,92	3,31	4,28	5,18	**5,28**	4,26	3,77	1,96	1,53
60	—	—	—	—	2,35	2,64	**3,20**	—	3,39	—	4,03	4,42	5,11	—	**5,42**	4,95	3,77	**1,96**	**1,53**
80	—	—	—	—	2,62	3,20	3,75	—	4,09	—	4,31	4,70	5,25	5,46	**5,83**	—	3,77	1,96	1,53
100	—	—	—	—	3,04	3,75	4,17	—	4,37	—	4,86	5,53	5,66	5,88	**6,11**	5,36	**3,91**	1,96	1,53
120	—	—	—	—	3,18	3,89	-	—	—	—	5,14	—	6,08	6,72	**6,67**	5,56	3,91	1,96	1,53
140	—	—	—	—	3,31	4,31	4,45	—	4,65	—	5,70	6,08	6,36	6,72	**6,81**	5,50	3,91	1,96	1,53

TABLEAU VI.

Influence de la température sur l'activité des amylases isolées.

Durée d'action en minutes	Accroissement du pouvoir réducteur, exprimé en mg. de maltose, pour la température de :																	
	10°	15°	20°	25°	30°	35°	40°	45°	50°	55°	60°	65°	70°	75°	80°	85°	90°
I. *Amylase du suc pancréatique de Chien* (10 cm³ empois d'amidon à 2 p. 100 + 5 cm³ sol. d'amylase).																	
20	—	—	12	14	18	**19**	18	17	17	16	12	—	—	—	—	—	—
40	11	14	17	25	34	**34**	32	32	28	26	20	12	—	—	—	—	—
60	15	23	28	35	43	**43**	42	41	38	36	25	12	—	—	—	—	—
80	18	28	34	43	52	**57**	54	51	46	45	34	12	—	—	—	—	—
100	21	32	40	48	62	**65**	62	58	53	53	34	12	—	—	—	—	—
120	24	35	45	55	71	**73**	71	64	59	58	34	12	—	—	—	—	—
II. *Amylasse de l'extrait de malt* (10 cm³ empois d'amidon à 2 p. 100 + 5 cm³ sol. d'amylase).																	
20	10	13	15	20	24	25	33	42	42	**50**	45	45	37	20	18	—	—
40	19	20	20	31	33	38	47	53	57	**62**	55	52	44	20	18	—	—
60	23	25	32	38	44	47	54	62	63	**68**	62	56	45	23	18	—	—
80	24	27	36	41	46	54	59	66	69	**74**	64	58	47	23	18	—	—
100	27	29	38	43	47	58	66	66	71	**75**	66	60	51	23	18	—	—
120	29	32	40	46	49	62	67	71	71	**77**	67	63	55	23	18	—	—
III. *Amylase du liquide de culture de bacillus mesentericus vulgatus.* (10 cm³ empois d'amidon + 10 cm³ sol. d'amylase). (Le milieu de culture contient PO_4K_3).																	
20	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—	—	—	—	10	**11**	—
40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	15	14	**14**	11
60	—	—	—	—	—	—	—	10	11	12	14	14	15	17	17	**20**	15
80	—	—	—	—	—	—	11	13	16	16	16	16	19	22	23	**24**	20
100	—	—	—	—	10	12	13	16	21	21	22	22	24	29	29	**29**	20
120	—	—	—	11	13	14	18	23	24	24	24	24	27	32	32	**34**	22

§ 4. — Discussion des résultats.

Une discussion aisée des résultats est permise par la réunion, dans le tableau VII, des optima de température de tous les enzymes étudiés.

1° Les enzymes d'origine animale. — Parmi les divers enzymes d'origine animale examinés, l'amylase est de beaucoup le plus intéressant pour la discussion du problème posé. Dans tous les sucs digestifs récoltés, le pouvoir amylolytique n'est point une curiosité ; il s'exerce certainement et avec force pour assurer l'exécution normale des processus de digestion. Or, la position de l'optimum de température est exactement la même pour l'amylase du Chien, laquelle agit normalement aux environ de 37°, et pour celle des deux poïkilothermes dont le rôle ne se joue qu'à des températures beaucoup plus basses. Cet optimum se situe à 35°-36°. Dans le cas des poïkilothermes, sa position ne s'est donc point adaptée aux conditions naturelles d'intervention de l'enzyme.

Toutefois, en faveur de la doctrine de l'adaptation, on peut invoquer le fait que les différences d'activité entre température optimum et températures beaucoup plus basses sont bien moins grandes pour l'amylase des poïkilothermes que pour celle du suc pancréatique du Chien. Lorsqu'on calcule, dans les trois cas, le rapport entre les quantités de maltose formées après 100 minutes à l'optimum et à 10°, on obtient les valeurs ci-dessous, d'après le tableau I :

Suc pancréatique de Chien..... $\frac{66}{16} = 4,1$

Suc digestif d'Escargot ..... $\frac{63}{31} = 2,0$

Suc digestif d'Aplysie ..... $\frac{117}{82} = 1,4$

Si le suc pancréatique agit 4 fois moins à 10° qu'à 38°, en revanche, pour un même abaissement de température, l'activité amylolytique n'est diminuée que de moitié pour le suc d'Escargot et de moins encore pour le suc d'Aplysie. La sensibilité de ces deux derniers est donc moindre ; ils conservent, à basse température, une puissance que le suc pancréatique d'homéotherme ne possède plus alors qu'à un très faible degré. L'adaptation des amylases aux conditions habituelles de

leur opération se traduirait donc plutôt par la conservation de leur pouvoir à basse température que par une modification de l'optimum.

Bien que, en quantité, le saccharose soit bien loin d'avoir l'importance de l'amidon, sa présence dans un grand nombre de productions végétales confère encore un intérêt physiologique assez grand aux propriétés comparées des sucrases de diverses origines. Celles étudiées par nous fait apparaître les faits suivants : pour la muqueuse intestinale du Chien, la position de l'optimum est très nette, à 45° ; il n'en est pas de même pour les enzymes correspondants des poïkilothermes. Sans doute, comme le montre le tableau II, les valeurs maxima de sucre interverti s'observent-elles aussi à une température déterminée, mais l'examen des colonnes voisines indique qu'elles diffèrent très peu de celles enregistrées à des températures plus hautes ou plus basses. En réalité, il y a ici, bien plutôt qu'un point, une zone optimum qui va de 35° à 45° chez l'Escargot, de 25° à 35° chez l'Aplysie. Par rapport à l'homéotherme, il y a donc déplacement particulièrement marqué chez l'Aplysie dont le suc intervertit énergiquement le saccharose à 25° tandis que la muqueuse intestinale de Chien est peu active. En outre, à 10°, la puissance maximum du suc d'Aplysie n'est réduite que de moitié alors que la sucrase de Chien est complètement inactive.

L'étude de la lactase chez des Chiens adultes et des mollusques tient beaucoup plus de la curiosité physico-chimique que de l'intérêt physiologique, le lactose ne figurant jamais dans l'alimentation de ces animaux. Les trois lactases paraissent d'ailleurs avoir des propriétés identiques : toutes trois situent leur optimum à 50°, toutes trois présentent un même rapport d'activité entre la température optimum et celle de 20° (après 100 minutes d'action : 2 pour le Chien, 2,4 pour l'Escargot, 2 pour l'Aplysie). Aucun fait ne peut être invoqué ici en faveur d'une adaption ; mais il faut dire qu'une adaptation n'aurait point eu à se faire, le jeu de l'enzyme n'entrant pas en ligne de compte pour l'utilisation des aliments.

Enfin, dans le domaine des enzymes agissant sur les glucosides il convient de relever la position élevée de l'optimum de l'émulsine, lors même qu'elle est récoltée chez des poïklothermes : 40° pour le suc d'Escargot, 50 pour celui d'Aplysie. Mais ici encore il s'agit de propriétés n'ayant aucune conséquence physiologique.

TABLEAU VII.

Les températures optima d'action des enzymes.

Produits expérimentés	Amylase	Sucrase	Lactase	Emulsine	Protéidase
Suc pancréatique de Chien.....	38	—	—	—	38 55
Extrait aqueux de muqueuse int. de Chien.....	—	45	50	—	—
Suc hépatopancréatique d'Escargot	35	35-45	50	40	—
Suc d'Aplysia punctata..	38	25-35	50	50	—
Extrait de malt.....	60	—	—	—	—
Extrait aqueux d'amande.....	—	—	—	50	—
Extrait aqueux de levure de bière.....	—	55	—	45	—
Liquide de culture de B. M. V.	80	—	—		65

Si la protéidase du suc pancréatique de Chien n'a été comparée à aucun enzyme similaire prélevé chez d'autres animaux, les observations permises par son étude n'en sont pas, pour cela, dénuées d'intérêt. Il est particulièrement curieux d'enregistrer une différence très nette entre les positions, incontestables parce que très bien délimitées, des optima de température suivant que l'activité protéolytique est mesurée par la disparition de la protéine (38°) ou évaluée par l'accroissement des groupements aminés libres (55°) (1).

Cette constatation doit être rapprochée des suivantes :

– le pH optimum d'hydrolyse trypsique de la fibrine est à 11,1 au début de l'attaque, à 7,8 dans la suite (Vonk et Heyn, (37) ;

— les produits initiaux de la digestion de la caséine par la trypsine sont adsorbés par une membrane dialysante à raison de 46 à 48 p. 100 de l'azote total présent alors que la rupture des liens peptidiques n'atteint pas 2,42 p. 100 [Rona et Mislowitzer (28)] ;

— attaquée par la trypsine, la caséine, recherchée en na-

(1) Vahlteich [**36**, avait déjà recherché l'influence de la température sur la libération de l'azote aminé au cours de l'hydrolyse trypsique de la caséine, mais ses investigations ont porté seulement sur les températures de 20, 30 et 40°. N'ayant point été étendues au-delà, elles ne peuvent faire apparaître l'existence d'un optimum puisque, en accord avec ce que nous observons nous-même, elles montrent que la vitesse de libération est plus grande à 30° qu'à 20°, et plus à 40° qu'à 30°.

ture, disparaît avec une extrême rapidité alors que les carboxyles libres sont à peine apparus [Grabar, 12].

Tous ces faits tendent à montrer l'existence de deux opérations bien distinctes et dont les principales conditions optima — pH et température — diffèrent fortement : un effondrement primitif de la molécule protéique ; une rupture ultérieure des liens peptidiques unissant les constituants des molécules plus petites apparues dans la phase initiale de la protéolyse.

La première opération est-elle seule le fait de la tryptase dont l'activité serait caractérisée par la nécessité de présence de la kinase ? Consisterait-elle « en une simple dépolymérisation des énormes micelles protéiques avec libération des unités Swedberg ? ». C'est là une hypothèse formulée par Terroine [35] mais qu'il n'est point encore possible de discuter complètement. Il n'en reste pas moins que la présente étude introduit une nouvelle distinction entre la désagrégation des molécules protéiques et la rupture des liens peptidiques.

De tous les faits observés dans l'étude des enzymes d'origine animale, il résulte que, ni la température à laquelle l'enzyme a été élaborée, ni celle habituelle de son intervention ne suffisent à beaucoup près, pour expliquer sa sensibilité thermique. D'une part, dans un même suc, on rencontre des enzymes à optimum très différent : le suc pancréatique rompt au mieux les liens peptidiques de la caséine à 55° alors qu'il présente son maximum d'action à 38° pour l'amylase ; dans le suc digestif d'Aplysie l'optimum est à 25°-35° pour la sucrase, 38° pour l'amylase, 50° pour la lactase et l'émulsine. D'autre part, les températures optima d'action des enzymes récoltés chez les poïkilothermes sont toujours beaucoup plus élevées que celles qui président normalement à leur élaboration et à leur activité.

Il n'est pas douteux toutefois que, pour des agents dont l'importance est particulièrement marquée dans les processus normaux de la digestion - l'amylase surtout et, secondairement, la sucrase - la puissance relative d'action à basse température est beaucoup plus grande chez ceux trouvés dans les sucs digestifs des deux mollusques étudiés que chez leurs correspondants secrétés par le Chien. Si de telles études n'étaient pas si laborieuses, il y eut eu un intérêt évident à les étendre à de plus nombreuses espèces poïkilothermes ; nous espérons pouvoir le faire dans la suite.

2° Les enzymes des graïnes. — L'amylase du malt et l'émulsine de l'amande présentent toutes deux un optimum de température élevé. En outre, la première n'agit que bien peu à basse température. Les conditions les plus favorables à l'intervention de ces enzymes sont donc bien loin d'être celles qui président à leur mise en œuvre lors de la germination des graines. Il n'y a aucun rapport entre la température optimum de l'action enzymatique et les températures que l'enzyme a subi pendant son élaboration ou qu'il connaîtra pendant son fonctionnement physiologique.

En outre les faits apportés dans le présent travail montrent qu'on n'est point en droit de généraliser la notion d'une faible sensibilité thermique des enzymes tirés des végétaux supérieurs. Si l'optimum de l'amylase du malt se place beaucoup plus haut que celui des amylases animales, en revanche, la température la plus favorable est exactement la même pour l'émulsine de l'amande et celle du suc digestif d'Aplysie.

3° Les enzymes des microorganismes, — La différence entre conditions de formation et d'action d'une part, position de l'optimum de l'autre, est encore beaucoup plus marquée pour les enzymes élaborés par le *Bac. mes. vulg.*. Ces agents ne possèdent en effet — et ceci n'est qu'une confirmation de divers faits déjà connus — qu'une très faible sensibilité thermique, l'optimum de la protéidase est à 65°, celui de l'amylase à 80°. En revanche, il n'y a aucune différence marquée entre les ferments de la levure — sucrase, émulsine — et ceux des enzymes de même nature d'origine animale.

Il n'y a donc point, à cet égard, de propriété commune à tous les microorganismes et la résistance à la chaleur paraît être limitée aux enzymes bactériens. Encore conviendrait-il, par une investigation plus étendue, de voir si elle s'observe pour tous les types d'enzymes élaborés par les bactéries et pour tous les représentants de ce groupe d'êtres.

4° La position comparée de l'optimum dans les produits bruts et les solutions d'enzymes isolés. — Les données réunies ci-dessous ne laissent aucun doute sur le caractère de la sensibilité thermique des enzymes. A très peu près, la température optimum des amylases est la même pour les produits bruts et pour les solutions d'enzymes isolés par adsorption et élution.

Comparaison de l'influence de la température sur les amylases brutes ou isolées.

	Suc pancréatique de Chien	Extrait de malt	Liquide de culture de B.M.V.
	—	—	—
Amylase brute.....	38	60	80
Amylase isolée.....	35	55	80-85

Il ne s'agit donc pas d'un phénomène contingent, dominé soit par la nature des matériaux accessoires qui accompagnent l'enzyme dans son milieu de formation, soit par les conditions qui ont présidé à son élaboration, mais bien d'une propriété essentielle, attachée à l'enzyme lui-même et qui doit être invoquée dans sa définition.

Conclusions.

Les conditions de température qui président à l'élaboration d'un enzyme, non plus que celles qui lui sont faites lors de l'exécution de son rôle physiologique, ne sont point celles qui déterminent sa sensibilité thermique. D'une part, des enzymes divers, élaborés en commun, rencontrés dans un même suc présentent des optima de température très différents ; d'autre part, l'optimum de température d'un enzyme donné est souvent identique, ou très voisin, chez un homéotherme et un poïkilotherme.

La notion d'une adaptation thermique des enzymes d'origine animale à leurs conditions habituelles d'action ne peut être fondée sur une différence d'optimum de température. En revanche, les amylases des poïkilothermes étudiés conservent, à basse température, une puissance marquée alors que celle du suc pancréatique de Chien est à peu près inactive.

Les enzymes des végétaux supérieurs ne présentent pas nécessairement un optimum de température plus élevé que ceux, de même type, élaborés par les animaux. Si, en effet, l'optimum de l'amylase du malt se place beaucoup plus haut que celui des diverses amylases animales, l'émulsine d'amande et celle du suc digestif d'Aplysie ont un même optimum.

La position de l'optimum de deux enzymes bactériens — protéidase et amylase du *Bac. mes. vulg.* — est toujours beaucoup plus élevée que celle relevée pour les mêmes types dans tous les autres groupes d'êtres vivants.

Les optima respectifs de température des amylases de suc pancréatique de Chien, d'extrait de malt et de liquide de culture du *Bac. mes. vulg.* sont à peu près identiques dans le produit diastasifère brut et dans la solution d'enzyme isolé par les procédés d'adsorption et d'élution. L'optimum thermique n'est donc pas le fait de propriétés contingentes du produit diastasifère, mais constitue bien une caractéristique de l'enzyme lui-même.

BIBLIOGRAPHIE.

1. Bach D. — Sur quelques conditions d'action de l'uréase de l'Aspergillus niger. *C. R. Soc. biol.*, 1929, **100**, 831-832.
2. Bertrand G. et Compton A. — Influence de la température sur l'activité de la salicinase. *Ann. Inst. Past.*, 1921, **35**, 702-712.
3. Bierry H. — Recherches sur les diastases qui concourent à la digestion des hydrates de carbone. *Thèse Fac. Sciences, Paris*, 1911.
4. Brinton W. — *Proc. of the Roy. Soc., London*, 1860-1862, **11**, 357-359 (d'après Riddle, *Am. J. of Physiol.*, 1909, **24**, 447-458.
5. Chesley C. L. — The influence of temperature upon the amylases of cold and warm-blooded animals. *Biol. Bull.*, 1934, **66**, 330-338.
6. Dastre A. — Fibrinolyse. Digestion de la fibrine fraîche par les solutions salines faibles. *Arch. Physiol. norm. et path.*, 1895, 5e Sér., **7**, 408-412.
7. Delezenne C., Mouton H. et Pozerski E. — Sur la digestion brusque de l'ovalbumine et du sérum sanguin par la papaïne. *C. R. Soc. biol.*, 1906, **58**, 309-312.
8. Effront J. — Sur les propriétés distinctives des amylases de différentes provenances. *C. R. Soc. biol.*, 1922, **86**, 274-275.
9. Fick A. und Murisier. — Ueber das Magenferment kaltblutiger Tiere. *Wurzburg Verhandl. d. Physikal. medicin. Gesell.*, 1873, N. F. **4**, 120-121.
10. Giaja J. — Etude des ferments des glucosides et des hydrates de carbone chez les Mollusques et chez les Crustacés. *Thèse Fac. Sc., Paris*, 1909.
11. Goris A. et Costy P. — Sur l'uréase des champignons. *C. R. Ac. Sc.*, 1923, **176**, 412-414.
12. Grabar P. — Sur le fractionnement des produits formés dans les stades initiaux de la digestion de la caséine par la tryptase activée. *C. R. Soc. biol.*, 1933, **112**, 1539-1542.
13. Hammarsten O. — Zur Frage nach der Identität der Pepsin- und Chimosinwirkung. *Zeit. f. physiol. Chem.*, 1908, **56**, 18-80.
14. Hoppe-Seyler F. — Ueber Unterschiede in chemischen Bau und der Verdauung höherer und niederer Tierer. *Arch. f. d. ges. Physiol.*, 1877, **14**, 395-400.

15. Hosaka Y. — Enzymes of warm-blooded and cold-blooded animals in their relation to temperature and other external conditions. *Jap. Med. Lit.*, 1918, **3**, 25 (d'après Chesley, *Biol. Bull.*, 1934, **66**, 330-338).
16. Krukenberg C. F. W. — *Untersuchungen aus dem physiol. Inst. der Univ. zu Heidelberg*, 1882. (d'après Riddle, *Am. J. of Physiol.*, 1909, **24**, 447-458).
17. Larguier des Bancels J. — De l'influence de la macération intestinale bouillie sur l'activité du suc pancréatique. *C. R. Soc. biol.*, 1902, **54**, 651-653.
18. Lecoq R. — Dissemblance entre les ferments amylolytiques des différentes préparations d'orge germé. *C. R. Soc. biol.*, 1924, **91**, 924-926.
19. Luchau. — Ueber die Magen-und Darmverdauung bei einigen Fischen. *Inaug. Dissert, Königsberg.*, 1878.
20. Marxer A. — Contribution à l'étude des produits bactériens. *Thèse Fac. Sciences, Strasbourg*, 1928.
21. Mueller H. — Bestehen Unterschiede in der Pepsinverdauung des Frosches und der Warmbluter ? *Arch. f. d. ges. Physiol.*, 1921, **193**, 214-224.
22. Oya T. and Harada K. — On amylase in pyloric caeca of Seriola quinquiradiata. *Journ. Imp. Fish Inst.*, 1926, **22**, 28 (d'après Chesley, *Biol. Bull.*, 1934, **66**, 330-338).
23. Pénau H. — Les diastases et leurs applications industrielles. *4e Congrès Chim. biol.*, Masson, Paris, 1933.
24. Rakoczy A. — Vergleichende Untersuchungen über die Verdauungs-fermente der Kalt-und Warmblüter I. Hecht-und Hundepepsin. *Zeit. f. physiol. Chem.*, 1913, **85**, 349-371.
25. Riassenzew. — *Wojenno medicinski Journal*, 1881, **90**, 259, (d'après Rakoczy, *Zeit. f. physiol. Chem.*, 1913, **85**, 349-371.
26. Richet Ch. et Mourrut. — *C. R. Ac. Sc.*, 1880, **86**, 879.
27. Riddle O. — The rate of digestion in cold-blooded vertebrates. The influence of season and temperature. *Am. J. of Physiol.*, 1909, **24**, 447-458.
28. Rona P. und Mislowitzer E. — Untersuchungen über fermentative Eiweissspaltung. *Bioch. Zeits.*, 1928, **196**, 197-222 und **200**, 152-165.
29. Sabalitschka Th. und Weidlich R. — Bestimmung der dextrinierenden und verzuckernden Wirkung der Amylase und Vergleich beider Wirkungen. *Bioch. Zeits.*, 1929, **207**, 476-493.
30. Slosse A. et Limbosch H. — De l'action du ferment salivaire dans ses rapports avec la température du milieu. *Arch. int. Physiol.*, 1908, **6**, 365-380.
31. Van Slyke D. D. and Cullen G. E. — The mode of action of urease and of enzymes in general. *J. of biol. Chem.*, 1914, **19**, 141-180.
32. Sullivan M. X. — The physiology of the digestive tract of elasmobranchs. *Am. Journ. of Physiol.*, 1905, **15**, 42-45.
33. Terroine E. F. — Action de la température sur la lipase pancréatique. *C. R. Soc. biol.*, 1910, **68**, 347.
34. Terroine E. F. — Contribution à la connaissance de la physiologie des substances grasses et lipoïdiques. *Ann. Sc. nat. Zool.*, 1919, Série 40, **4**, 1-397.
35. Terroine E. F. — Le métabolisme de l'azote. ** Physiologie des substances protéiques I. Aliments, Digestion, Absorption, Enzymes digestifs. *1 vol. VII-384, Les Presses Universitaires de France, Paris*, 1936.

36. Vahlteich H. W. — A study of the action of trypsin on casein. *J. of biol. Chem.*, 1929, **82**, 737-749.
37. Vonk H. J. and Heyn A. — Das pH optimum bei der Wirkung von Trypsin auf Fibrin. *Zeit. f. physiol. Chem.*, 1929, **184**, 169-182.
38. Weitz R. et Lecoq R. — Analogie entre la ptyaline et l'amylase de l'orge germé. *C. R. Soc. biol.*, 1924, **91**, 926-927.
39. Willstätter R., Waldschmidt-Leitz E. und Hesse R. F. — Ueber Pankreas-amylase. *Zeit. f. physiol. Chem.*, 1922, **126**, 143-168.
40. Yo O. T. — Sur la nature physiologique de la diastase secrétée par la glande de l'éclosion chez les Plagiostomes (Scyllio-rhinus caniccula L. Gill.). *C. R. Ac. Sc.*, 1931, **193**, 545-456.
41. Yung E. — Recherches sur la digestion des poissons. *Arch. de biol. exp.*, 1890, sér. 3, **7**, 121-201.

CHAPITRE II.

Le pH optimum d'action des enzymes bactériens dépend-il du pH du milieu de culture dans lequel ils ont été élaborés ?

§ 1. — Objet du travail.

Il est peu de conditions auxquelles les biochimistes attachent actuellement plus d'importance pour caractériser et différencier les enzymes, qu'au pH optimum de leur action. Très souvent, lorsque, à l'intérieur d'un groupe d'enzymes ayant des propriétés très voisines, sinon même identiques, on veut établir une distinction, on la fonde soit sur le pH optimum, soit sur les limites de pH à l'intérieur desquelles l'enzyme agit.

Une telle manière de faire admet implicitement que le pH optimum ou les limites de pH permettant l'action sont des caractéristiques nécessaires de l'enzyme et non point la conséquence des conditions plus ou moins contingentes qui ont présidé à son élaboration. Et pourtant quelques faits qui paraissent avoir passé inaperçus de la plupart des biochimistes tendent à montrer que le pH optimum d'une action diastasique est bien loin d'être fixe, qu'il peut au contraire présenter d'importantes variations suivant la nature du milieu dans lequel l'enzyme considéré a été élaboré.

Etudiant en 1909-1910 le ferment protéolytique élaboré par la bactéridie charbonneuse, Lazarus [1] montre tout d'abord qu'on peut entraîner ce microorganisme à se développer dans des milieux présentant des réactions très différentes. Ceci fait, il constate que l'optimum de la protéolyse enzymatique se déplace vers l'alcalinité lorsque l'enzyme a été formé dans un milieu acide.

Marxer [2] poursuivant une étude analogue en 1928 sur le *B. subtilis* conclut qu'on peut, à volonté, éloigner l'optimum de réaction de l'activité protéolytique de ce microorganisme dans le sens alcalin « et ceci en cultivant le bacille dans un milieu plus acide ».

Il nous a paru qu'il y avait là un phénomène trop important pour ne pas être l'objet d'investigations nouvelles et plus étendues. Il était, en effet, indispensable de s'adresser à un microorganisme dont le développement est compatible avec de très larges variations de pH du milieu de culture ; en outre, d'examiner le cas d'enzymes de types très différents. Or, le *Bacillus mesentericus vulgatus*, qui végète à la fois dans des milieux très acides comme dans d'autres très alcalins, et qui libère un enzyme protéolytique et un enzyme amylolytique tous deux très actifs, se prête particulièrement bien à ce genre d'investigations. Nous avons donc repris à son aide l'étude du problème de la variation du pH optimum des enzymes en fonction des conditions de leur production.

Au total :

Cultiver le Bac. mes. vulg. *sur de nombreux milieux identiques par ailleurs, mais différant entre eux uniquement par le pH, l'étendue des différences de pH de ces milieux n'étant limitée que par les valeurs extrêmes permettant le développement ;*

Séparer les liquides de culture après développement et rechercher l'influence exercée par le pH ayant présidé à l'élaboration des enzymes sur le pH optimum d'action de l'amylase et de la protéidase obtenues ;

tel est l'objet du présent travail.

§ 2. — Technique.

Les procédés mis en œuvre — obtention, mesure d'activité — pour l'étude de l'amylase et de la protéidase rejetées au dehors par le *Bac. mes. vulg.* au cours de son développement sont exactement les mêmes que ceux décrits dans le précédent travail.

La réalisation des pH désirés, soit pour les bouillons, soit pour les divers milieux dans lesquels chaque enzyme agit, a

été obtenue par l'emploi des mélanges indiqués par Clark et contrôlée à l'aide des réactifs colorés habituels.

§ 3. — Résultats expérimentaux.

Les deux groupes de résultats sont consignés dans les tableaux I et II. L'optimum d'action est mis en évidence par l'emploi de caractères gras. Les données expérimentales ne donnent lieu, par elles-mêmes, à aucune observation.

TABLEAU I.

Le pH optimum d'action de l'amylase du *Bacillus mesentericus vulgatus* en fonction du pH du milieu de culture.

(Dans tous les mélanges : 10 cm³ d'empois d'amidon à 2 p. 100 + 5 cm³ liquide de culture ; le tout amené au pH désiré. Conditions d'action : temp. 70° ; durée, 60 m. Les valeurs expriment le maltose formé en mg.)

pH de l'action amylolytique	pH du milieu de culture sur lequel s'est développé le B.M.V.						
	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	9,6
4,0	54	22	20	15	10	—	—
4,4	55	22	20	15	12	—	—
4,8	57	26	20	17	12	—	10
5,2	57	26	24	21	15	10	10
5,6	57	26	27	21	15	10	11
6,0	**69**	28	27	21	15	10	**12**
6,4	62	28	27	21	15	**12**	11
6,8	54	28	30	24	15	11	10
7,2	54	**44**	**32**	24	15	10	10
7,6	54	44	28	24	15	—	10
8,0	54	42	27	**33**	**16**	—	10
8,4	54	42	27	31	14	—	—
8,8	54	42	27	27	14	—	—
9,2	54	42	27	27	14	—	—
9,6	54	42	27	27	14	—	—

§ 4. — Discussion des résultats.

L'examen des deux tableaux ne laisse aucun doute sur la réponse à donner au problème posé.

Aussi bien pour l'amylase que pour la protéidase élaborées par le *Bac. mes. vulg.*, le pH optimum d'action ne constitue nullement une caractéristique nécessaire de l'enzyme. C'est

une valeur contingente et qui varie grandement — de 6,8 à 9,6 pour la protéidase, de 6,0 à 8,0 pour l'amylase — avec la réaction du milieu dans lequel les enzymes se sont formés. Mais, constatation curieuse dont nous n'entrevoyons point la cause, la variation du pH d'action, en fonction du pH de production, n'est point continue. Dans le cas de l'amylase, tout comme dans celui de la protéidase, les mêmes faits s'observent : si l'on part d'un produit obtenu en milieu fortement acide pour se diriger peu à peu vers un autre formé en milieu très alcalin, le pH d'action s'élève fortement, puis, à un moment donné, retombe ; de telle manière qu'aux deux extrémités des pH de production, le pH optimum d'action est identique.

Une telle contingence dans la position du pH optimum d'action jette évidemment un très grand discrédit sur l'emploi de cette valeur pour séparer des enzymes d'un même type, mais ayant des origines différentes.

Toutefois, les faits présentement observés ne signifient pas que, en toute circonstance, le pH optimum d'une action diastasique ne dépend uniquement que des conditions dans lesquelles l'enzyme a été formé. S'il en était ainsi, les très nombreux enzymes que renferme parfois un produit naturel — le suc digestif de l'Escargot, par exemple — présenteraient tous un même pH optimum, et nous savons qu'il n'en est rien.

A côté des constatations précédentes ayant immédiatement trait à la question étudiée, il en est une autre, subsidiaire, qui mérite d'être faite. Dans des milieux de culture identiques par ailleurs, différant uniquement par leur pH, la production des enzymes dépend grandement de ce pH. Pour l'amylase, cette production est d'autant plus intense que le pH du milieu de culture se rapproche davantage de la limite supérieure d'acidité compatible avec le développement du bacille. On voit, en effet, qu'au pH optimum d'action, la quantité de maltose formé est environ 6 fois plus grande pour un milieu producteur à pH 4 que pour un autre à pH 9. Un fait identique, mais de sens inverse, s'observe pour la protéidase ; c'est en s'approchant de la limite supérieure d'alcalinité compatible avec le développement que se forme la quantité la plus grande d'enzyme ; au pH optimum d'action, il y a deux fois plus de caséine détruite dans le même temps pour des pH de production allant de 9,2 à 12,8 que pour un pH de 5,2. La protéidase se forme donc plus abondamment en milieu alcalin et l'amylase en milieu acide.

TABLEAU II.

Le pH optimum d'action de la prodéidase du *Bacillus mesentericus vulgatus* en fonction du pH du milieu de culture.

(Dans les mélanges: 10 cm³ solution de caséine à 3 p 100 + 5 cm³ de liquide de culture ; le tout amené au pH désiré. Conditions d'actions : Temp. 55° ; durée 120 m. Les valeurs expriment la quantité de caséine disparue en mg.).

pH de l'action protéolytique	pH du milieu de culture sur lequel s'est développé le B. M. V.								
	5,2	6,0	7,2	8,0	9,2	10,0	10,8	12,0	12,8
4,0	46	65	137	139	192	180	230	228	161
4,4	48	91	149	149	215	185	230	225	205
4,8	45	91	149	149	222	185	230	227	209
5,2	52	91	149	149	232	185	231	230	209
5,6	55	95	149	161	244	193	231	234	211
6,0	70	95	154	163	244	193	233	237	217
6,4	75	107	154	163	245	193	234	237	246
6,8	**122**	125	154	167	247	196	231	240	**248**
7,2	92	**145**	160	167	246	197	232	240	240
7,6	95	99	**172**	170	253	201	232	239	241
8,0	43	76	166	172	253	207	240	**245**	230
8,4	43	73	160	**174**	253	207	245	240	231
8,8	37	77	152	170	252	207	246	235	240
9,2	37	75	154	167	254	213	245	237	226
9,6	40	74	151	167	**261**	**215**	**250**	230	226
10,0	40	75	150	169	239	214	245	232	227
10,4	43	72	152	171	240	210	241	232	227
10,8	39	75	157	165	240	207	239	227	225
11,2	42	75	154	165	235	207	235	224	225
11,6	40	78	150	165	235	207	235	224	225
12,0	42	73	151	165	236	207	234	224	225
12,4	39	73	151	166	236	207	235	223	225
12,8	44	74	150	165	235	205	235	225	225
13,2	40	71	151	163	235	205	231	223	224

Conclusions.

Le pH optimum d'action de l'amylase et de la protéidase libérés au cours de la végétation du *Bac. mes. vulg.* varie très fortement en fonction du pH du milieu de culture. L'allure discontinue de la variation est la même dans les deux cas. Lorsque la réaction du milieu de culture passe, par étapes successives, d'une forte acidité à une forte alcalinité, et cela entre les limites extrêmes permettant le développement du bacille, le pH optimum d'action s'élève progressivement jusqu'à une valeur maximum et retombe ensuite.

La production des enzymes par le *Bac. mes. vulg.* est fortement influencée par la réaction du milieu dans lequel cet organisme croît ; elle est beaucoup plus abondante, en milieu acide, pour l'amylase, en milieu alcalin, pour la protéidase.

BIBLIOGRAPHIE.

1. Lazarus. — Inflluence de la réaction des milieux sur le développement et l'activité protéolytique de la bactéridie de Davaine. *C. R. Ac. Sc.*, 1909.
2. Marxer A. — Contribution à l'étude des produits bactériens. *Thèse Fac. Sciences Strasbourg*, 1928.

DEUXIEME THÈSE.

Question posée par la Faculté :

Les fermentations des sucres.

Vu et approuvé :
Strasbourg, le 9 novembre 1936.
Le Doyen de la Faculté des Sciences,
A. DANJON.

Vu et permis d'imprimer :
Strasbourg, le 10 novembre 1936.
Le Recteur de l'Académie
Président du Conseil de l'Université,
J. DRESCH.

IMPRIMERIE M. DECLUME
LONS-LE-SAUNIER.